

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07628

研究課題名(和文) 環境要因への曝露に対するエピゲノム異常の可視化システムの構築

研究課題名(英文) Establishment of an imaging system for environment-induced epigenome alterations

研究代表者

服部 奈緒子 (Hattori, Naoko)

星薬科大学・先端生命科学研究所・特任准教授

研究者番号：30611090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、環境要因曝露に対するエピゲノム異常を可視化するシステムを構築することを目的とした。まず、mCherry上流にテトラサイクリン応答エレメントとEF1、下流にT2A/Puro耐性遺伝子を組み込んだベクターを作製した。また、内在性のプロモーター下流にCRISPR-Cas9システムを用いて遺伝子を導入するシステムの構築も試みた。さらに、検出系の有効性確認のためのCRISPR-dCas9-Dnmt3aシステムによるゲノム領域特異的なメチル化の系も作製した。炎症曝露によってメチル化されやすい内在性プロモーターを dextran sulfate投与マウスの大腸上皮細胞を用いて同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境要因への曝露は発がんの関連要因もしくは原因であるが、その分子機構は不明な点が多い。本システムによって、エピゲノム異常からの発がんの分子機構が解明されるだけでなく、エピゲノム異常誘発の抑制・解除によるがん予防の効果をモニターすることが可能となる。将来的には、新たながん予防法の開発や新規のエピゲノム異常誘発要因の同定に繋がる。

研究成果の概要(英文)：In this study, my aim was to develop an imaging system for detecting epigenome alterations caused by exposure of environmental factors. Firstly, I constructed a vector containing tetracycline-responsive element and EF1 promoter upstream of the mCherry gene, along with a T2A sequence and a puromycin-resistant gene. Additionally, I employed a knock-in system using the CRISPR/Cas9 system to insert the gene downstream of the endogenous promoter. To confirm the effectiveness of the imaging system, I developed a system to induce gene-specific DNA methylation using the CRISPR-dCas9-Dnmt3a system. Moreover, to identify promoters that are sensitive to aberrant DNA methylation triggered by chronic inflammation, I conducted a genome-wide DNA methylation analysis on colonic epithelial cells from mice administered with dextran sulfate.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス DNAメチル化 環境要因 がん

1. 研究開始当初の背景

(1) 環境要因によるエピゲノム異常の誘発 (図1)

生涯の喫煙・飲酒・感染・食物・環境中の化学物質曝露が、発がんの関連要因もしくは原因であることが知られている。喫煙・飲酒・感染に関しては、ゲノムおよびエピゲノムの異常が分子機構とされている。一方、食物や環境中の化学物質曝露に関しては、分子疫学研究からはエピゲノム異常の誘発が示唆されているが [Mahmoud and Ali, Nutrients 2019]、実験動物を用いた証明や分子機構の解明が必要である [Sapienza&Issa, Annu Rev Nutr 2016]。

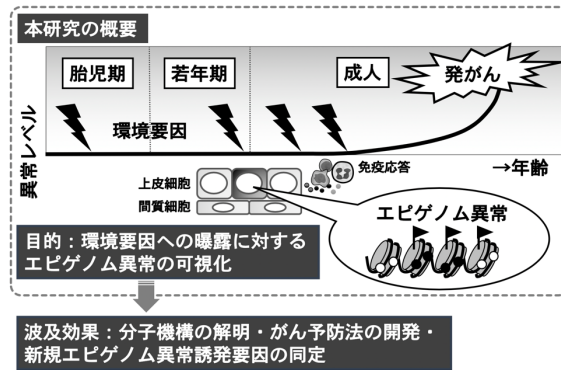


図1 本研究の背景と概要

また、エピゲノム異常の誘発因子に関する知見は極めて限定的であり [Chappell et al, Mutat Res-Rev Mutat Res 2016]、同定方法の開発・分子機構の解析方法の開発は喫緊の課題である。

(2) エピゲノム異常誘発の抑制・解除によるがん予防

疫学研究から食事や bioactive food components が、がんの予防効果があることは示されており、エピゲノム変化の関与は以前から提唱されている [Milber, J Nutr 2004]。申請者は、慢性炎症によって正常大腸上皮細胞にエピゲノム異常が誘発されること、抗生物質投与による慢性炎症の減少と腸内細菌叢の変化が、エピゲノム異常の誘発を抑制し、大腸がん発生を抑えることを明らかにした [Hattori et al, Cancer Sci 2019]。このように、エピゲノム異常の誘発を防ぐこと、誘発されたエピゲノム異常を除去することは、がん予防の観点から極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究では、環境要因への曝露に対するエピゲノム異常を可視化するシステムの構築を目的とする (図2)。

具体的には、マウス ES 細胞を用いて in vitro 可視化システムを作製し、CRISPR-dCas9-Dnmt3a による検証、報告のある化合物・食品成分の影響とその分子機構を明らかにする (Aim 1)。

次に、ES 細胞から遺伝子改変マウスを作製し、AOM+DSS による大腸炎誘発で有効性を検証、in vivo 可視化システムを構築する (Aim 2)。

最後に、大腸発がんを誘発し、食餌や腸内細菌叢のエピゲノムへの影響を可視化し、がん予防法開発への応用を示す (Aim 3)。

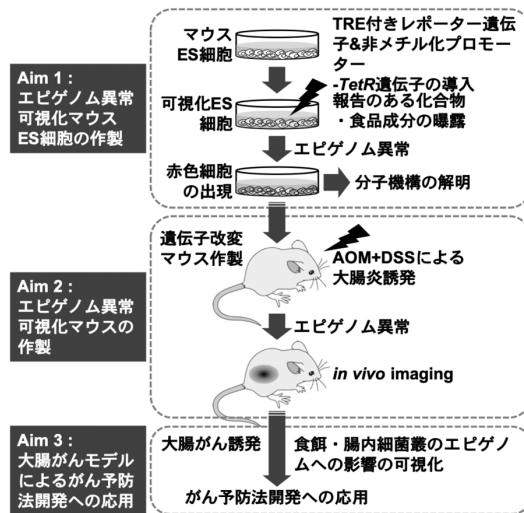


図2 本研究の目的

3. 研究の方法

【Aim 1】 エピゲノム異常可視化マウス ES 細胞の作製

マウス ES 細胞を用いて、TetR で発現制御されるレポータータンパクとプロモーター DNA メチル化で発現制御される Tet リプレッサー (TetR) の組合せにより、エピゲノム異常を可視化する。レポーターとしては、in vivo imaging に適する mCherry を使用する。

まず、mCherry 遺伝子の上流にテトラサイクリン応答エレメント (TRE) と EF1α プロモーター、下流に T2A を挟んで Puro 耐性遺伝子を組み込んだベクターを作製する。ES 細胞への導入・選択を行い、mCherry 陽性赤色 ES 細胞を得る。その後、HoxA5 プロモーター下流に CRISPR-Cas9 システムを用いて TetR・VP16 遺伝子を導入する。非メチル化 HoxA5 プロモーターで発現誘導された TetR によって、mCherry プロモーターが不活性化し、ES

細胞の赤色が消失する。この細胞に DNA メチル化異常が誘発されると、レポーター遺伝子が再発現し、細胞の赤色が回復する(図3)。

本研究で使用する *HoxA5* プロモーターは、申請者の所属研究室の網羅的 DNA メチル化解析によって、炎症曝露の大腸上皮細胞と大腸がんで高メチル化、正常大腸上皮細胞で非メチル化のプロモーターとして同定された [Katsurano et al, *Oncogene* 2012]。また、DNA メチル化データベースおよび既存報告から、*HoxA5* プロモーターは、ES 細胞で非メチル化・神経を除く正常細胞で低メチル化、多くのがん細胞で高メチル化であり、本研究の可視化システムに最適である。

検出系の有効性は、CRISPR-dCas9-Dnmt3a システムを用いて証明する(図4)。ES 細胞樹立後は、報告のある化合物(ヒ素・一酸化窒素)・食品成分(vitamin)等による赤色細胞の再出現を確認し、*HoxA5* プロモーターの DNA メチル化解析も行う。

最終年度は、ゲノム全体のメチル化変化・DNMT タンパクの発現・*TetR* プロモーターへの結合因子の同定・エピゲノム異常関連 pathway 等の解析を行って、エピゲノム異常誘発の分子機構を明らかにする。

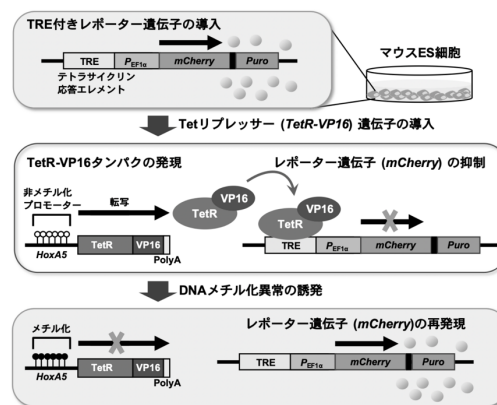


図3 可視化 ES 細胞の樹立

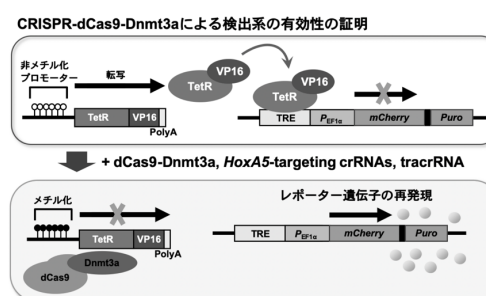


図4 検出系の有効性の検証方法

【Aim 2】エピゲノム応答可視化マウスの作製

Aim 1 で作製した ES 細胞を用いて、遺伝子改変マウスを作製する。その後、dextran sulfate (DSS) 投与による大腸炎症を誘発して、in vivo imaging によるシステムの検証を行う。*mCherry* レポーターの発現が観察された場合は、大腸上皮細胞を用いた *HoxA5* プロモーターの DNA メチル化解析を行う。

【Aim 3】大腸がんモデルによるがん予防法開発への応用 [令和3年度後半-令和4年度]

Aim 2 で作製したマウスに azoxymethane (AOM)+DSS 投与で大腸がんを誘発し、*mCherry* レポーターを観察する。同時に、申請者が DNA メチル化異常の抑制を立証済みである抗生物質投与群では、*mCherry* は観察されないことを検証する。また、発がんリスクを上げる高脂肪食、がん予防効果のある食品成分(葉酸・ビタミン)の効果も *mCherry* レポーターで imaging する。*mCherry* レポーターに変化が合った場合は、大腸上皮細胞を用いて DNA メチル化解析を行う。

4. 研究成果

(1) エピゲノム異常可視化マウス ES 細胞の作製

DNA メチル化の変化を可視化可能なマウス ES 細胞を作製するために、ベクターの構築を行った。*mCherry* 遺伝子の upstream にテトラサイクリン応答エレメントと $EF1\alpha$ プロモーター、downstream に T2A を挟んで Puro 耐性遺伝子を組み込んだベクターの構築を行った。既存のベクターを元にコンストラクションを行い、目的のベクターを得ることができた。また、非メチル化プロモーター下流に導入する *TetR*・*VP16* 遺伝子については、ベクターを購入した。

マウス ES 細胞への遺伝子導入に関しては、これまでに lentivirus および transfection 試薬を用いた方法を利用していた。本研究に際してより効率を上げる為に electroporation の系を導入した。pCMV-EGFP および pCAGGS-EGFP を用いて検討を行い、80%以上の高効率で導入可能な条件を決定した。

(2) ゲノム編集技術を用いた遺伝子導入システムの構築

本研究では、内在性の非メチル化プロモーター下流に CRISPR-Cas9 システムを用いて *TetR*・*VP16* 遺伝子を導入する必要がある。従来の方法である相同組換えに依存する方法は挿入効率が低かったことから、広島大学佐久間博士の開発した相同組換えに依存しない新規遺伝子挿入法 PITCh システムを用いることとした。検討のために、マウス ES 細胞を用いて、*Pou5f1* 遺伝子の下流を標的として pCRIS-PITChv2 ベクターを用いて *EGFP* 遺伝子を導入した。マウス ES 細胞の核内で *EGFP* を発現する細胞が検出され、PITCh システム

による遺伝子導入の系が構築できた。

(3) ゲノム領域特異的なメチル化誘導システムの構築

本研究で作製する検出系の有効性を確認のため、CRISPR-dCas9-DNMT3A システムを用いてゲノム領域特異的にメチル化する必要がある。そのシステムの構築のために、dCas9-DNMT3A の組込まれたベクターを購入した。

また、本研究代表者はすでに、ヒト大腸がん細胞株 HCT116 を用いて、*UCHL1* 遺伝子プロモーター領域がメチル化されると EGFP が発現する細胞 31UL23 を樹立している。そこで、31UL23 細胞に、dCas9-DNMT3A ベクターと *UCHL1* targeting guide RNA を transfection し、DNA メチル化の誘導を解析した。EGFP の発現は確認されなかったが、dCas9 と DNMT3A の発現は western blotting で確認された。その原因として、31UL23 細胞システムの EGFP promoter が長期培養に伴ってメチル化されてしまったことが考えられる。今回の検討で、dCas9 と DNMT3A が正常に発現することは明らかになったので、31UL23 細胞システムではなく、マウス ES 細胞を使用した系を構築する。

(4) DNA メチル化高感受性プロモーターの同定

計画当初は、所属研究室の網羅的 DNA メチル化解析 [Katsurano et al, Oncogene 2012] によって、炎症曝露の大腸上皮細胞と大腸がんで高メチル化、正常大腸上皮細胞で非メチル化のプロモーターとして同定された *HoxA5* 遺伝子のプロモーターを使用する想定をしていた。しかしながら、その後の論文で *HoxA5* プロモーターのメチル化では、遺伝子発現の抑制は不十分であるという報告がされた。そのために、本研究で使用する内在性非メチル化プロモーターとして、他の領域を使用する必要性が生じた。

そこで、慢性炎症曝露によって、よりメチル化されやすい領域を同定するために、大腸の慢性炎症モデルである dextran sulfate (DSS) 投与マウスを作製した。DSS 非投与マウスおよび投与マウス 3 匹から大腸上皮細胞を単離し、Infinium Mouse Methylation BeadChip によるゲノム網羅的な DNA メチル化解析を行った。DSS 投与マウスの大腸上皮細胞でメチル化されているいくつかのプロモーターが得られたので、データベースから ES 細胞と大腸がんにおける DNA メチル化情報を入手し、スクリーニングを行った。

まとめと今後の展開：

エピゲノム異常可視化マウス ES 細胞の作製が可能な状況が整った。しかしながら、その ES 細胞から遺伝子改変マウスを作製するには時間と要するので、今後は、ES 細胞を用いた *in vitro* の系で報告のある化合物（ヒ素・一酸化窒素）・食品成分（vitamin）等による検証と、天然化合物等を用いたスクリーニングを行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Naoko Hattori, Yu-Yu Liu, Toshikazu Ushijima	4. 巻 2691
2. 論文標題 DNA Methylation Analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 165-183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-3331-1_13	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 服部奈緒子, 牛島俊和	4. 巻 36
2. 論文標題 DNAメチル化阻害剤	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 遺伝子医学mook	6. 最初と最後の頁 196-203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 服部奈緒子, 牛島俊和	4. 巻 272
2. 論文標題 DNA脱メチル化剤および変異型IDH阻害剤の臨床導入と新規開発の現状	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 106-114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Naoko Hattori, Yu-Yu Liu, Yoshimi Yasukawa, Hideyuki Takeshima, Toshikazu Ushijima
2. 発表標題 Epigenomic alterations in tumor ecosystems in response to intrinsic and extrinsic factors
3. 学会等名 Scientific Session at the Society of Toxicology (SOT) 62nd Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 服部奈緒子、リュウ ユコ、安川佳美、牛島俊和
2. 発表標題 正常組織エコシステムのエピゲノム変化と発がんへの関与
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部奈緒子、リュウ ユコ、安川佳美、竹島秀幸、牛島俊和
2. 発表標題 環境要因による正常組織エコシステムにおけるエピゲノム変化
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部奈緒子、牛島俊和
2. 発表標題 環境要因によるエピゲノム攪乱と発がんへの関与
3. 学会等名 22EEGネットシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部奈緒子
2. 発表標題 幹細胞のエピゲノム記憶に関わるヒストンリーダーの同定
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 服部奈緒子
2. 発表標題 Identification of bivalent chromatin domain in senescent cells
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 服部奈緒子
2. 発表標題 Visualization of multivalent histone modification in cellular differentiation and cellular senescence
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関